

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **02271255 A**

(43) Date of publication of application: **06.11.90**

(51) Int. Cl

G01N 33/531

(21) Application number: **01091858**

(71) Applicant: **TOSOH CORP**

(22) Date of filing: **13.04.89**

(72) Inventor: **HAGI NORIO**

**(54) PREPARATION OF STANDARD SOLUTION OR
DILUTE SOLUTION**

(57) Abstract:

PURPOSE: To realize more accurate immunoassay by supporting an antibody recognizing an object to be measured on a carrier not by a chemical covalent bond but by physical adsorption.

CONSTITUTION: A specimen is brought into contact with a polystyrene carrier having adsorbed an antibody recognizing an object to be measured in immunoassay and subsequently separated from the carrier. As the antibody supported on the carrier, any antibody

recognizing an object to be measured can be used without limit. For example, it may be a polyclonal antibody and a monoclonal antibody. The polystyrene carrier is not specially limited in its shape or size. Since the carrier supporting the antibody recognizing an object to be measured is prepared by physical adsorption, said carrier can be obtained without performing complicated operation. It is pref. to use a specimen same to a living body specimen subjected to immunoassay in order to prepare a reagent for performing accurate immunoassay.

COPYRIGHT: (C)1990,JPO&Japio

BEST AVAILABLE COPY

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-271255

⑬ Int. Cl.³
G 01 N 33/531

識別記号 庁内整理番号
7906-2G

⑭ 公開 平成2年(1990)11月6日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全6頁)

⑮ 発明の名称 標準液又は希釈液の製造方法

⑯ 特 願 平1-91858

⑰ 出 願 平1(1989)4月13日

⑱ 発 明 者 萩 規 男 神奈川県大和市上和田180番地の1

⑲ 出 願 人 東 ソ ー 株 式 会 社 山口県新南陽市大字富田4560番地

明細書

1 発明の名称

標準液又は希釈液の製造方法

2 特許請求の範囲

(1) 免疫測定において使用される標準液又は希釈液の製造方法であって、前記免疫測定において測定されるべき被測定物を認識する抗体を吸着したポリスチレン製担体と試料を接触させた後該試料と担体を分離することを特徴とする方法

3 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は標準液又は希釈液の製造方法に関するものであり、詳しくは免疫測定において測定されるべき被測定物を認識する抗体を使用するアフィニティクロマトグラフィーによる前記製造方法に関するものである。

(従来技術)

例えば血清又は尿等の動物生体試料(これらは時にはヒトに由来する試料である)に含まれる蛋白質等の生体成分を、該成分を認識する抗体を用いて測定する方法が知られている。

このような免疫測定方法においては、検量線を作製するための、既知濃度の非測定物を含有する標準液や生体試料を希釈するための希釈液(以下これらを単に免疫測定用試薬と記載する)が使用される。

免疫測定用試薬は、生体試料と被測定物以外の成分が同一であることが正確な免疫測定のために要求される。例えば、生体試料がヒト血清又はヒト血漿である場合に、ヒト血清又はヒト血漿以外の溶液を希釈液として使用すると、いわゆる血清効果が引き起こされ、前記試料中の被測定物濃度が正しい値を示さないことがある。

前記した様な不都合を解消するために、従来は、例えば標準液であれば免疫測定に供される生体試料を材料としてこれに既知濃度の被測定物を

添加したり又例えば希釈液であれば生体試料をそのまま使用することがある。

以上の様に、生体試料自体を利用して標準液材料又は希釈液を製造することは、特別な準備や面倒な操作を必要としないため、簡便である。しかし、例えば生体試料がヒト血清又はヒト血漿である場合であって、被測定物がフェリチン、インシュリン又は種々のホルモンである様な場合には、これら被測定物が通常のヒト生体試料中に初めから存在していることから、これを予め除去することが必要である。

このような課題を考慮して、近年ではより正確な免疫測定を実施するため、生体試料を被測定物を認識する抗体を固定化した担体と接触させる、いわゆるアフィニティクロマトグラフィーを実施することにより生体試料中の被測定物を除去し、標準液又は希釈液を製造する方法が知られる様になった。この方法によれば、生体試料を前記した様な担体に接触させることで、被測定物以外の成分組成が同一の免疫測定用試薬を製造することが

できる。

(発明が解決しようとする課題)

従来のアフィニティクロマトグラフィーによる方法においては、被測定物を認識する抗体の担体への結合は活性化された担体表面の化学基と抗体との化学的結合、即ち共有結合により実現される。ところが、活性化された担体表面と抗体の化学反応は人為的なコントロールが不可能であることから、例えば抗体中の抗原認識部位が該表面と反応してしまうことがあり、該抗体がもはや被測定物を認識する能力を失っていたり、あるいは認識能力が低下していることがあり、十分に被測定物の除去された免疫測定用試薬を製造することができないという課題がある。

本発明者はアフィニティクロマトグラフィーにより免疫測定用試薬を製造する方法について検討した結果、担体と被測定物を認識する抗体の結合を改良することで被測定物を認識する抗体の失活を防ぎ、もってより正確な免疫測定を実現し

得る免疫測定用試薬を製造する方法を発明するに至った。即ち本発明は、免疫測定において使用される標準液又は希釈液の製造方法であって、前記免疫測定において測定されるべき被測定物を認識する抗体を吸着したポリスチレン製担体と試料を接触させた後該試料と担体を分離することを特徴とする方法であり、以下詳細に説明する。

(課題を解決するための手段)

本発明は、担体と被測定物を認識する抗体を化学的な共有結合ではなく、物理的な吸着によって行うことで該抗体の失活を防ぎ、もってより優れた免疫測定用試薬を製造するものである。

担体に担持させる抗体は、被測定物を認識する抗体であれば制限なく使用できる。それらは例えばポリクローナル抗体であっても良いし、モノクローナル抗体であっても良い。例えば、本発明の方法により製造された免疫測定用試薬を使用する免疫測定で用いられる抗体を使用すれば、本発明を行うために新たな抗体を調製する必要がなく

なる。

本発明で使用するポリスチレン製担体は、形状又はその大きさにおいて特別な制限はない。また、ポリスチレン製との言葉は、他の物質によりその核を形成し、表面にポリスチレン被覆を施した担体を使用することを妨げない。即ち本発明で使用する担体は表面がポリスチレンに由来する抗体吸着能力を有する担体をであれば良い。担体は、以下説明する手順で抗体を吸着させた後、通常行われる様に、例えば牛血清アルブミン等を用いてブロッッキング処理することにより他の蛋白質の吸着を阻止し得る様にしておくことが好ましい。ブロッッキング操作自体は公知の方法を適用することができる。その一例として、例えば本発明の実施例で採用した様に、重量比0.1%の牛血清アルブミンを含むPBSを担体を吸着担持した担体と接触させ、4℃にて24時間放置する等の作業を例示することができる。

本発明で使用する、被測定物を認識する抗体を担持する担体は、前記した様に物理的な吸着に

より調製されるから、複雑な操作を行うことなしに得ることができる。例えば担体を予めメタノール等で洗浄し乾燥させた後、担持させようとする抗体と混和し、攪拌しながら48時間放置するなどしても良いが、放置する時間、その温度等は検討の上、適宜決定すれば良い。

本発明の製造方法は、例えば適当な空間を提供する反応容器中に被測定物を認識する抗体を担持する担体及び試料を入れることで行っても良いし、容器自体又は容器内へきをポリスチレンで被覆したものを担体として使用し、抗体を担持させ、そこに試料を添加することで行っても良いが、製造された免疫測定用試薬と担体との分離等を容易にするためには、抗体を担持する担体を適当なカラムに充填し、カラムクロマトグラフィーの形態で行うことが好ましい。カラムクロマトグラフィーの形態によれば、担体に担持された抗体と被測定物の接触をむらなくしかも速やかに行うことができ、また、カラムからの溶出液をフラクションコレクター等を用いて採取することで、担体と試

料の分離を実現することもできる。

本発明の製造方法をカラムクロマトグラフィーの形態で行うためには、担体を5～300 μ mの球状に形成すると良い。このような担体によればカラムからの溶液の流出も速く、その表面積も比較的大きいからより多くの抗体を担持させることができる。

試料はこれまで説明してきた様に、免疫測定に供される生体試料と同一のものを使用することが、正確な免疫測定を行うための試薬を製造するために好ましい。例えば免疫測定に供される生体試料がヒト血清である場合には試料としてヒト血清を、生体試料がヒト血漿である場合には試料としてヒト血漿を使用することが好ましい。

本発明の方法に従って製造された免疫測定用試薬は、担体と分離された後、特別の操作をすることなしに希釈液又は濃度0（零）の標準液として、また被測定物を必要量添加することにより、既知の被測定物濃度を示す標準液として使用できる。

（発明の効果）

本発明の方法により、より正確な免疫測定を実現するための標準液又は希釈液を製造することができる。本発明の製造方法では、被測定物を認識する抗体をポリスチレンが有する特別な吸着性質を利用して、該抗体の活性を低下させることなしに担持させた担体を使用することにより、より効率的に試料中の被測定物を捕足し、除去することができる。

本発明の製造方法に使用される、例えば抗体を担持した担体等は、複雑な操作なしに簡単に準備することが可能であり、従って、本発明の方法はその準備をも含め、短時間で、しかも簡便に行うことができる。

本発明の製造方法は特に、担体を適当なカラムに充填して実施することが好ましい。即ち、カラムクロマトグラフィーによれば、担体に担持された抗体と被測定物の接触をむらなくしかも速やかに行うことができ、またカラムからの溶出液を

フラクションコレクター等を用いて採取することで、担体と試料の分離を実現することもできるからである。これらのことは、被測定物の除去が実質的に一部の抗体のみで行われることによる急激な被測定物除去能力の低下を防ぎ、より長期間に渡って均一な免疫測定用試薬を製造できることを意味するものである。また、一度使用されたカラムの洗浄等も、抗体が被測定物を遊離する様な緩衝液等を添加することで簡便に行うことができるという効果も有している。これは、例えば3M濃度程度のチオシアン酸を添加した緩衝液等を使用して行えば良い。

（実施例）

以下本発明を更に詳細に説明するために実施例を示すが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例 1

粒径40～60 μ mの、アミノ基と結合する

N-ヒドロキシサクシンイミドエステルを有するポリメタクリレート製ゲル（バイオラッド社製アフィブレップ10（商品名）；以下ゲル1と記載する）及びポリスチレンゲル（東ソー（株）製；粒径約50 μ m、以下ゲル2と記載する）を担体として、以下の操作により被測定物を認識する抗体を担持させた。

まず、両ゲルを1.0mlのゲル容量となるように計りとり、ゲル1については4℃のA液（塩化ナトリウム5g/l、リン酸カリウム0.4g/l、リン酸水素2カリウム2.3g/l、アジ化ナトリウム1g/lを含むpH7.5の水溶液）にて洗浄した後、ミルシュタインとケーラー（G.Kohler, C.Hilstein, Nature, 258巻495頁1975年）の方法に従って調製された抗ヒトフェリチンマウスモノクローナル抗体（1gGクラス）

1.0mgを1.0mlのA液に溶解したものをゲル1に添加して懸濁し、更に4℃にて48時間反応させた。

ゲル2に対しては、メタノールにて洗浄した

mlずつ分画した。

なお、以上の操作は4℃条件下にて行い、カラムからの溶出液の流速は0.02ml/minとした。

実施例 3

実施例2の操作に引続き、5mlのA液をカラムに添加して溶出させた。続いてカラムからの流速を0.15ml/minに変更して実施例2と同様の4mlの試料について同様の操作を行った。

実施例 4

実施例3の操作に引続き5mlのA液をカラムに添加して溶出させた。続いてカラムからの流速を1.0ml/minに変更して実施例2と同様の6mlの試料について同様の操作を行った。

実施例 5

実施例2～4で得られた溶出液分画中のヒト

後、減圧下で乾燥させ、1.0mlのA液にて希釈された1.0mgの前記抗体を添加して懸濁し、更に48時間反応させた。

ゲル1及びゲル2の前記懸濁液をA液にて洗浄した後、重量比0.1%の牛血清アルブミン及び10mMモノエタノールアミンを含むA液を添加し、4℃にて24時間放置してブロッキング処理を行った。

以上のようにして調製された被測定物（ヒトフェリチン）認識抗体を担持する担体を、ガラスカラムにそれぞれ充填し、A液にて洗浄、平衡化した。なお、該カラムのベッドボリュームは1mlである。

実施例 2

実施例1で調製された2種のカラムに対し、最終的に50ng/mlとなるようにヒトフェリチン（サンフレンドケミカル社製）を添加した正常牛血清を3mlずつ添加した。それぞれのカラムからの溶出液をフラクションコレクターにて1

フェリチン濃度を測定した。

ポリスチレン製マイクロタイタープレート（メンコ社製、96ウェル）の各ウェルに、実施例1で使用した抗ヒトフェリチンマウスモノクローナル抗体を50mM炭酸ナトリウム緩衝液（pH9.6）に1.0 μ l/mlになるように溶解し、100 μ lずつ分注し、4℃にて24時間放置した。

B液（塩化ナトリウム5g/l、リン酸水素ナトリウム0.2g/l、リン酸水素2ナトリウム1.15g/l、塩化カリウム0.2g/l、tween-20 0.5ml/mlを含むpH7.4の水溶液）にて各ウェルを洗浄した後、重量比0.1%の牛血清アルブミンを含むB液を300 μ lずつ各ウェルに分注し、4℃にて24時間放置してブロッキング処理した。

ヒトフェリチンをそれぞれ0、1.25、2.5、5、10、20、40、80、160、320ng/mlとなるように添加した正常牛血清を100 μ lずつ各ウェルに添加し、37℃に

て2時間反応させた後、B液にて3回洗浄し、実施例1とは異なる部位でヒトフェリチンを認識する、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識されたマウスモノクローナル抗体を添加し、37℃で更に2時間反応させた。各ウェルに100 μ lの酵素基質(2, 2'-アジノビス(3-エチルベンゾジアゾリン6-スルホン酸)2アンモニウム及び過酸化水素を含むpH4の緩衝液)を分注し、室温にて2時間放置した後、シュウ酸溶液(pH1)を添加して酵素反応を停止させ、各ウェルの415nmにおける吸光度を測定し、この免疫測定におけるヒトフェリチン濃度と吸光度の関係を明らかにした。

なお、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗体は、Nakane, P. K. らの方法(J. Histochem. Cytochem., vol. 22, 1084~1091頁1974年)に従って調製した。

続いて、実施例2~4で得られた各分画について同様の測定を行い、先の結果を標準値として各フラクション中のヒトフェリチン含有濃度を算

出した。これらの結果を図1に示す。

各フラクション中のヒトフェリチンはいずれの流速で溶出を行った場合でも均一に除去されていることが分る。特に、カラムからの溶出液の流速を0.15ml/min程度以下とした時には、この傾向が明確である。

なお、実施例2及び3において、A液を添加した後のフラクションからは、ヒトフェリチンは測定されなかった。

4 図面の簡単な説明

図1は本発明の実施例の結果を示す。図中の黒丸はゲル1の結果を、白丸はゲル2の結果を示している。

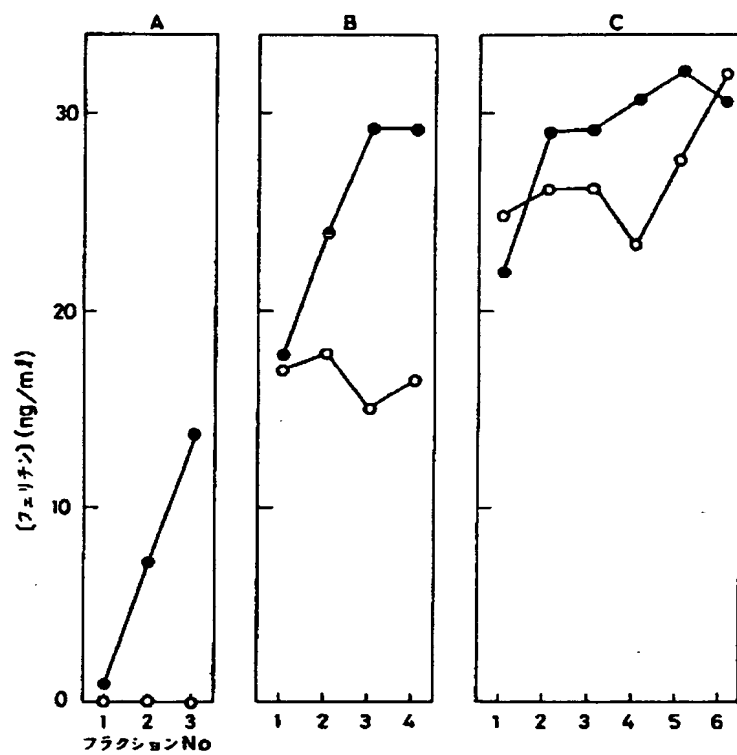
図1-Aは実施例2で得られフラクションについての、図1-Bは実施例3で得られたフラクションについての、図1-Cは実施例4で得られたフラクションについての、実施例5での結果を示す。

各図において、横軸は実施例2~4で得られた

フラクションの内、平衡化に用いたA液以後に取得されたフラクションのNo.を示し、縦軸は各フラクションに含有されていたヒトフェリチンの濃度を示す。

特許出願人 東ソー株式会社

図 1



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.